

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 00145277 B1  
(43)Date of publication of application: 28.04.1998

(21)Application number: 94021000  
(22)Date of filing: 23.08.1994

(71)Applicant: CHEIL JEDANG  
CORPORATION  
(72)Inventor: HWANG, JEONG KEON  
JIN, KI HONG  
NOH, HYUN MO  
PARK, YONG MAN

(51)Int. Cl C12N 1/20  
C12N 9/50

(54) PROTEASE WHICH IS ACTIVE AT LOW TEMPERATURE HAVING SODIUM DODECYL SULFATE (SDS) RESISTANCE AND ALKALI RESISTANCE, AND MICROORGANISM PRODUCING IT

(57) Abstract:

PURPOSE: *Vibriometschnikovii* sp. RH 530A producing protease which is active at low temperature having SDS resistance and alkali resistance, gene coding the protease, recombinant plasmid containing the gene, and transfected microorganism by the recombinant plasmid are provided.

CONSTITUTION: Low temperature active proteases having SDS resistance and alkali resistance which is expressed by *Vibriometschnikovii* sp. RH 530 (KCTC 0088BP) are named Vap K of 27,500 dalton and Vap T of 45,000 dalton. Vap K keeps 90 % of its activity in SDS solution of 3 % and Vap T keeps 35 % of its activity under the same condition. Each Vap K and Vap T has highly similarity to alkalic elastase of bacillus, bacillus subtilisine Carlsberg etc. and preserves one of active regions such as Asp residue at Asp-30 (Vap K) and Asp-31 (Vap T).

COPYRIGHT 2000 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (19940825)  
Final disposal of an application (registration)  
Date of final disposal of an application (19980203)  
Patent registration number (1001452770000)  
Date of registration (19980428)

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. 6  
C12N 1/20  
C12N 9/50

(11) 공고번호 특0145277  
(24) 등록일자 1998년04월28일

(21) 출원번호	특1994-021000	(65) 공개번호	특1996-007772
(22) 출원일자	1994년08월23일	(43) 공개일자	1996년03월22일
(73) 특허권자	제일제당주식회사 김정순 서울특별시 중구 태평로 2가 150		
(72) 발명자	노현모 서울시 서초구 반포2동 미주아파트 1동 1003호 진기홍 서울시 양천구 목4동 황제아파트 5동 512호 박용만 인천시 중구 신흥동3가 64번지 황정근 인천시 관교동 쌍용아파트 2동 509호		
(74) 대리인	최학현 황주명		

심사관 : 김형준

(54) 나트륨 도데실 설페이트와 알칼리성 폐하에 내성을 갖는 저온활성형 단백질 분해효소 및 이를 생산하는 미생물

요약

본 발명은 나트륨 도데실 설페이트와 알칼리성 pH에 내성을 갖는 저온활성형 단백질 분해효소, 및 이의 제조방법 및 이를 생산하는 미생물을 제공한다.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭] 나트륨 도데실 설페이트와 알칼리성 폐하에 내성을 갖는 저온활성형 단백질 분해효소 및 이를 생산하는 미생물  
[도면의 간단한 설명] 제1도는 Vap K, Vap T 및 사비나제(Savinase)의 pH변화에 대한 최적활성결과도이다. 제2도는 Vap K, Vap T 및 사비나제의 pH변화에 대한 잔존활성결과도이다. 제3도는 Vap K, Vap T 및 사비나제의 온도변화에 대한 최적활성결과도이다. 제4도는 Vap K, Vap T의 N-말단아미노산서열 및 기존알칼리성 단백질 분해효소와의 비교도이다. 제5도는 Vap T 유전자를 함유한 pAK 1의 유전자지도이다. 제6도는 Vap T 유전자의 염기서열이다. 제7도는 Vap T의 기존알칼리성 단백질 분해효소와의 아미노산 상동성을 나타낸 것이다. [발명의 상세한 설명] 본 발명은 한국 토양으로부터 분리동정한 호염기성 균주 비브리오 메취니코비 중 RH530(Vibrio metschnikovii sp. RH 530) 및 동균주로부터 세포외로 분리되는 2종류의 새로운 나트륨도데실 설페이트(SDS)내성, 알칼리내성, 저온활성단백질 분해효소, 및 이를 코딩하는 유전자, 이 유전자를 함유한 재조합 플라스미드 및 이 재조합 플라스미드에 의해 형질전환된 미생물에 관한 것이다. 현재 세계적으로 사용되는 세제용 단백질 분해효소는 알칼리내성, 고온활성, 계면활성제내성을 기본으로하여, 표백제 내성효소가 주축이 되어 있다. 이들 효소를 생산하는 균주는 주로 바실러스 종(Bacillus species)이며 곰팡이 트리티라치움 알BUM(Tritirachium album)에서 생산되는 프로테이나제 케이(proteinase K)는 알칼리성 단백질 분해효소로서 활성 pH가 8-11 정도인 서브틸리신(Subtilisin) 계열에 속하는 세린단백질 분해효소이다. (Ebeling 등, Eur. J. Biochem. 47, P91-97, 1974). 프로테이나제 케이는 산업적 중요성으로 인하여, 열 안정성, Ca<sup>2+</sup>의존성, 3차원 구조의 해석이 밝혀졌으며, 최근에는 아미노산 서열 및 유전자의 염기 서열 등이 결정되었다. 그러나, 프로테이나제 케이는 고가로 판매되고 있으므로 특수용으로 사용되고 있고, 세제용단백질 분해효소는 사용되고 있지 않다. 현재 시판되고 있는 NOVC 사나 GIST BROCADES사의 세제용단백질 분해효소는 서구형 세탁조건에 적합한 효소, 즉 고온활성형 단백질 분해효소이며, 저온수를 사용하는 한국 및 동남아의 세탁조건에는 적합하지 않은 효소로 알려져 있다. NOVO사에서 개발한 저온활성형 단백질 분해효소인 사비나제(Savinase) 및 GIST BROCADES사의 같은 유형의 효소인 막사칼(Maxacal)은 실제로 20℃-25℃에서 활성이 매우 낮은 편이고, 뛰어나게 저온활성을 보이는 단백질 분해효소는 아직 개발되어 있지 않은 상태이다. 따라서, 본 발명의 목적은

이러한 기존의 단백질 분해효소들의 단점이 적은 단백질 분해효소를 생산하는 미생물 및 그 효소를 제공하는데 있으며, 본 발명에서 개발된 신규의 단백질 분해효소는 저온활성이 높으며, 알칼리성 pH 및 세정원료인 SDS에 강한 내성을 보이고, 본 발명에 따라 분리된 신규미생물은 박테리아에 속하여 배양액의 회수가 쉬운 장점을 가지고 있기 때문에 상기 목적에 부합하다 할 것이다. 새로운 유형의 알칼리성 단백질 분해효소를 개발하기 위해, 강한 염기성조건하에서 선별배양법을 통하여 토양으로부터 강한 단백질 분해활성을 보이는 호 염기성 균주를 분리 동정하였다. 분리된 균주는 현미경 분석, 그람 염색법, API 20E, 20NE 및 32GN 키트등을 통하여 동정한 결과 분리된 균주가 비브리오 메취니코비로 밝혀졌으며, 이를 비브리오 메취니코비 중 RH 530으로 명명하였다. 이 균주는 1993년 10월 18일에 한국과학기술원 유전공학연구소 유전자 은행에 기탁되어 기탁번호 KCTC 0088BP로 분양 가능하다. 젤라틴 SDS-전기영동을 이용한 활성 염색법(Heussen 등, J. Gen. Microbiol. 187. p235-239, 1980)을 통하여 본 균주가 생산하는 단백질 분해효소의 종류 및 특성을 밝혔다. 실험결과, 본 균주는 분자량이 27.5KDa(prt7)인 알칼리성 주요 단백질 분해효소와 최소 6종류의 미량 단백질 분해효소를 분비하였다. 젤라틴-SDS전기영동시 단백질 분해효소 저해제를 처리한 결과, 27.5KDa (prt7), 45KDa(prt3)을 포함한 대부분의 단백질이 세린계 단백질 분해효소이며, 나머지 1종이 메탈계 단백질 분해효소로 밝혀졌다(표 1). prt7과 prt3은 SDS에 하여 강한내성을 나타내었으며, 이들은 각각 Vap K 및 Vap T라 명명하였다.

[표1]

억제제	Prt7	Prt1	Prt2	Prt3	Prt4	Prt5	Prt6
DEP, PMSF, 트립신억제제	+	-	+	+	+	+	+
EDTA, O-페난트론	-	+	-	-	-	-	-
POB, E-64, 캡타틴	-	-	-	-	-	-	-
중립타이리닌, 트립신억제제							
CaCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub> , MgSO <sub>4</sub>	-	ND	ND	-	-	-	-
HgCl <sub>2</sub>	-	+	+	+	+	+	+
ZnCl <sub>2</sub>	-	ND	ND	-	+	+	+
LiCl	-	ND	ND	-	-	-	+
머캅토에탄올, DTT	-	+	+	-	-	-	+

+ : 젤라틴-PAGE후에 단백질분해효소 활성의 저해가 있는 경우- : 젤라틴-PAGE후에 단백질분해효소 활성의 저해가 없는 경우  
ND : 미탐색 Vap K 및 Vap T를 황산암모늄으로 분획침전하여, DEAE Sephadex A-25 크로마토그래피, CM-Sephadex C-25 크로마토그래피 및 Sephacry 1 S-200 크로마토그래피를 이용하여 각각 정제하였다. 정제된 효소는 SDS-전기영동상에서 그 분자량이 27.5KDa, 45KDa으로 나타났다. Vap K 및 Vap T의 SDS-내성을 합성 펩타이드인 석시닐-L-Ala-L-Pro-L-Phe-P-니트로아닐리드(sAAPfN)을 지질로 사용하여 결정하였다. 표 2에 나타난 것처럼 Vap K는 3%의 SDS용액에서도 90%이상의 활성을 유지하였으며, Vap T는 동일조건에서 35%의 활성을 유지하였다.

[표2]

SDS 농도 (%)	활성도 (%)	
	Vap K	Vap T
0	100	100
0.5	103	86
1	98	74
2	96	47
3	93	35

반응조건 : 1) 온 도 : 25℃ 2) 시 간 : 30분 3) 기질농도 : 0.5mM sAAPfNVap K 및 Vap T, NOVO사의 Savianse 와 최적활성 pH를 조사한 결과 제1도에 나타난 바와같이 사비나제는 pH 8-12사이이며, Vap T와 Vap K는 pH 9-12 사이임을 알 수 있었고 (제1도), pH별로 잔존 활성을 조사한 결과 Vap T와 Vap K가 pH11 이상에서 사비나제보다 훨씬 안정함을 알 수 있었다. (제2도). 제3도에 나타난 바와같이 저온활성형으로 개발된 NOVO 사의 사비나제보다 Vap K는 20℃에서 2배 더 활성이 높으며, 50℃이상의 온도에서도 훨씬 안정한 활성을 유지함을 알 수 있었다. Vap K 및 Vap T의 최적활성 온도는 65℃ 부근임을 알 수 있고, 따라서 Vap K 및 Vap T는 사비나제보다 저온 및 고온에서 활성이 더 좋으며, 산업적 응용성이 높다고 판단된다(제3도). Vap K 및 Vap T에 대하여 각각 36개와 40개의 N-말단 아미노산 잔기의 서열을 결정하였다(제4도). 이들은 바실러스의 알칼리성 엘라스타제(BAE)(Kaneto 등, J. Microbio . 172, 467-473, 1989), 바실러스 서브틸리신 칼스버그(CAR)(Smith등, J. Biol. chem. 35, p1155-1156, 1968), 비브리오 아지노라이트쿠스 프로테아제(VPA)(Deane등, Gene, 76, p281-288, 1989), 및 트리티라치움 알부 프로테아제 K(PRK)(Jany등, FEBS Lett. 199, p139-144, 1986)와 높은 유사성을 보였다. 또한 활성부위의 하나인 Asp 잔기가 Asp-30(Vap K)와 Asp-31(Vap T)로서 잘 보존 되어있다. Vap T를 코딩하는 유전자를 환형성 방법을 통하여 대장균에 클로닝 하였다. 모든 양성균주들은 동일한 6.5kb HindIII 조각을 가지는 제조할 플라스미드를 함유하였으며, 이중 한종을 pAK 1이라 명명하였다. pAK 1의 유전자 지도는 제5도에 나타나있다. Vap T의 유전자는 다음과 같은 성질을 가졌다. 1) Vap T의 모든 오픈리딩프레임(open reading frame)은 547개 아미노산을 코딩하며 5.7KDa의 전구체를 가질 수 있는 1.641bp로 이루어지며(제6도), 2) 성숙형 Vap T는 45KDa에 해당하는 428개의 아미노산으로 구성되며, 3) Vap T의 전구체는 프리(pre)-펩타이드, 프로(pro)-펩타이드 그리고 성숙형 효소로 이루어지며, 4) 오픈리딩프레임의 말단에 13개의 뉴클레오타이드로 이루어진 스템 루프(stem-loop)구조가 전사종결 신호로 작용함을 특징으로 한다. Vap T의 예측된 아미노산서열은 다음의 특징을 갖는다. 첫째, Bacillus elastase YaB, B. licheniformis subtilisin Carlsberg, V. alginolyticus exoprotease A 및 T. album proteinase K와 비교적 높은 상동성(homology)을 보임을 특징으로 한다. 둘째, 세린(serine)계열의 단백질 분해효소에서 전하전달 체계를 이루는

세가지 부위가 His-65, Asp-30, Ser-368로 잘 보존됨을 특징으로 한다(제7도).셋째, 서브틸리신의 활성부위에 해당하는 His와 Ser간의 거리가 다른 서브틸리신 계열간의 거리보다 약 150개 아미노산이 더 길다(제6도).넷째,  $\text{Ca}^{2+}$ 결합부위가 프로테이나제 케이보다는 서브틸리신과 가까움을 특징으로 한다.본 발명은 이하의 실시예를 통하여 예시된다.[실시에 1](비브리오 메취니코비 중 RH 530의 탐색 및 동정)1g의 토양표본을 3ml의 증류수에 넣은 다음 섞은 뒤 상등액 1ml을 알칼리성 LSC-한천배지(pH 11)(1ℓ당 10g 박토-트리톤, 5g 효모추출물, 10g 염화나트륨 및 15g 박토-한천)에 직접 도말한 뒤 30℃에서 배양하였다. 24시간 지난 뒤 알칼리성 LSC-한천배지(pH 11)에 3차례 도말함으로써 각 콜로니(colony)를 선택하였다. 단백질 분해효소의 생산은 콜로니 주위에 투명환이 생기는 정도로 측정하였다. 선별된 균주는 현미경 분석, 그람-염색법, API 20E, 20NE, 32GN 키트 등을 사용하여 동정하였다.[실시에 2](비브리오 메취니코비 중 RH 530로부터 분리되는 단백질 분해효소의 분석)본 균주로부터 분리되는 단백질 분해효소들을 분석하기 위하여 젤라틴 SDS-전기영동을 통한 활성염색법을 사용하였다. 배양액으로 원심분리한 뒤, 1ml의 상등액을 0.1ml SDS(25% wt/vol)과 0.1ml의 글리세롤과 섞은 뒤 37℃에서 30분간 둔 뒤 SDS와 젤라틴을 기질로 사용하는 전기영동을 4℃에서 실시하였다. 전기영동 뒤, 젤을 트리톤 X-100에서 1시간 씻어 SDS를 제거한 뒤, 0.1M 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)에서 37℃의 온도로 3시간 둔 뒤 1%(wt/vol) 아미도 블랙으로 염색하였다. 단백질 분해효소의 활성은 젤라틴이 제거되어 투명해지는 부위로써 측정하였다. 알칼리성 등전점(isoelectric point)을 가지는 Vap K의 측정을 위해서, 단백질을 전통적인 SDS-나 자연(native) 전기영동(pH 6.8)에서 전극의 방향을 반대로하여 분리한 뒤 탈지분유-한천배지에 정착함으로써 그 활성을 측정하였다.[실시에 3](단백질 분해효소에 대한 저해제에 영향)다음의 단백질 분해효소저해제의 단백질 분해효소의 활성에 대한 영향은 젤라틴-젤을 트리톤 X-100과 0.1M 트리스-HCl 완충용액에서 반응시킬 때 각종 저해제를 처리하여 결정하였다: DFP(1mM), PMSF(0.5-2mM), EDTA(2-5mM), o-페난트롤린(1mM), 콩트립신억제제(1mM), E-64(1mM), PCMB(1mM), 펩스타틴(1mM), 엘라스타티날(10μg/mL), 머캅토에탄올(20mM), DTT(20mM), 및 히스티딘(0.5%),  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ , LiCl, ZnCl,  $\text{HgCl}_2$  등의 2가 양이온의 영향은 모두 1mM의 농도에서 수행하였다.[실시에 4](Vap K 및 Vap T의 정제)LSC-배지(pH 10.5)에서 배양된 1ℓ의 배양액을 원심분리후 밀리포어 필터로 여과하였다. 전체 단백질 분해효소 활성을 80% 황산암모늄을 가하여 침전시킨 뒤 원심분리하였다. 단백질 침전물을 100ml의 20mM 트리스-HCl(pH 8.0)에서 녹인 뒤 동일 완충용액에서 투석하였다. 투석된 용액을 DEAE Sephadex A-25에 적용하였다. 여기서 Vap K의 활성을 포함하는 용출물을 다시 동일 칼럼에 적용하고 최종 용출물을 10mM 인산칼륨에 완충용액(pH 7.0)으로 평형화한 뒤 CM-Sephadex C-25 칼럼에 적용하였다. 이 후 0-0.5M KCl 구배를 포함하는 동일 완충용액으로 용출시켰다. 활성 Vap K 분획은 모아서 -70℃에 보관하였다. Vap T의 정제는, 위의 DEAE Sephadex A-25 칼럼을 0-0.5M NaCl 구배로 용출시켰다. 활성 Vap T 분획을 모아서 10mM 인산칼륨 완충액에서 투석한 뒤 CM-Sephadex C-25 칼럼에 한번 더 적용한 뒤 Amicon 농축기에서 농축하였다. 농축된 용액을 2.5x50cm Sephacryl S-200 칼럼에 적용한 뒤 50mM 트리스 HCl(pH 8.0)으로 용출시켰다.[실시에 5](단백질 분해효소의 활성 측정)단백질 분해 효소의 활성은 아조카세인(Sigma)의 가수분해 정도를 측정함으로써 결정하였다. 표준 반응용액(0.5ml)은 0.1% 아조카세인, 50mM CAPS[3-(사이클로헥실아미노)프로판설포산] 완충용액과 적당히 희석된 효소용액을 포함하였다. 37℃에서 30분간 반응시킨 뒤 15% 트리클로로아세트산을 등량 가하여 반응을 정지시키고, 얼음에 5분간 두었다가 침전물을 3분간 원심분리(12,000g)한 뒤 상등액을 흡광도를 440nm에서 측정하였다. 활성 1유니트는 표준 반응에서 흡광도 0.1만큼 증가시키는 효소의 양으로 정하였다.[실시에 6](N-말단 아미노산 서열분석)정제된 Vap K 및 Vap T를 SDS-폴리아크릴아미드 겔에 적용한 뒤 폴리비닐리덴 디플루오라이드(PVDF) 막(Matsudaira, J. Biol. chem. 257, p397-401, 1987)에 옮겨 가스상 마이크로시퀀서에 적용하여 N-말단 아미노산 서열을 정하였다.[실시에 7](Vap T 유전자의 클로닝)비브리오 메취니코비 중 RH 530의 단백질 분해효소를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위하여, 염색체 DNA를 Hind III로 절단한 뒤 pUC19 HindIII 부위에 집어 넣었다. 연결된 혼합물은 대장균(E. coli) JM101에 형질전환시키고, 탈지분유-한천배지에서 투명환 생성여부로서 양성 형질 전환주를 선별하였다.[실시에 8](Vap T 유전자의 염기 서열분석)상기의 재조합 플라스미드 pAK1을 여러 가지 제한 효소나 Ba131 핵산 분해효소를 이용하여 아클로닝하였다. 이중 pAK1의 4.2kb의 HindIII -PstI 조각을 M13 파아지의 복제형 DNA에 접합시켜 삽입하였다. 이들을 대장균 JM101에 형질전환시켜 여러 플라크를 얻었다. 이 플라크를 JM101이 있는 2YT 배지(16g 트리톤, 8g 효모추출물, 5g NaCl) 배지에서 6시간 성장시킨 후 12,000rpm에서 2분간 원심분리하여 상등액을 얻고, 이 상등액 25μl를 SDS 전개 완충용액(2.7ml 글리세롤, 0.3ml 10 X TEB, 1ml 1% SDS, 1ml EDTA, 1ml BPB(3ml) 5μl와 섞어 0.8% 아가로스로 12시간 전개시켜 DNA의 크기를 결정하였다.공지의 데일(Dale) 방법에 의해 연속적으로 절단된 파아지 DNA를 얻었다. 즉 상기 재조합 파아지 DNA 1μg을 0.5 A<sub>260</sub>의 올리고머(RD20:5'-CGACGGCCAGTGAATCCCC-3')와 결합시켜 부분적으로 이중가닥을 만든 후, 다시 제한 효소 EcoRI으로 42℃에서 2시간동안 T<sub>4</sub> DNA 중합효소 완충용액(33mM 트리스-아세트레이트, pH 7.8, 66mM K-아세트레이트)하에서 절단한 후, 여기서 1 유니트의 T<sub>4</sub> DNA 중합효소를 첨가하여 10분 간격으로 3'-5' 엑소뉴클레아제로 절단하고, 또한 여기에 1mM dGTP 및 13 유니트의 TdT를 첨가하여 호모폴리머테일링(homopolymer tailing)하였다. 이 DNA를 다시 회수하여 상기의 RD20과 다시 결합시키고 T<sub>4</sub> DNA 중합효소 하에서 접합시킨 다음, 상기와 같이 형질전환시키고, DNA의 크기를 분석하였다. 이렇게 제조된 다양한 크기의 외래 유전자인 세라티오펜티다제 유전자를 함유한 파아지 외가닥 유전자는 중첩된 부위를 가지고 있으며, 이를 공지의 생거(Sanger) 방법에 의해 염기서열을 결정하였다.

## (57)청구의 범위

### 청구항1

비브리오 메취니코비 중 RH 530로부터 발현된 분자량 45,000 달톤의 나트륨도데실 설페이트내성, 알칼리내성 및 저온활성인 하기 아미노산 서열을 갖는 단백질 분해효소:

MET Ile Lys Lys Asn Glu Leu Lys Arg Tyr Val  
 Lys Leu Gly Thr Ile Ala MET Val Ala Gly Ser Ala Thr Ser Ala Ile Ala His  
 Pro Thr Leu Thr Phe Asp Lys Ala Ser Ile Pro Thr Arg Tyr Ile Val Lys Phe  
 Lys Glu Asn Glu Glu Phe Phe Ser MET Ala Asn Asn Pro Phe Trp Gly Pro Arg  
 Ile Gly Glu Glu Ala Leu Leu Ser Glu Ile Glu Ala Ser Asp Ile Glu Pro Ile  
 Gly His Asp Ala Leu Tyr Ser Ala Lys Leu Ala Glu Glu Arg Val Glu Ala Leu  
 Ser Glu Thr Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Ala Val Lys Ala Asp Glu Leu Glu Asp  
 Ser Glu Ala Gly Asn Glu Thr Ile Cys Ile Ile Asp Ser Gly Tyr Asp Leu Ala  
 His Asn Asp Leu Ser Gly Asn Arg Val Thr Gly Thr Asn Asp Arg Gly Thr Gly  
 Glu Trp Tyr Ile Pro Gly Ser Asn Asn Ala His Gly Thr His Val Ala Gly Thr  
 Ile Ala Ala Ile Ala Asn Glu Gly Val Lys Gly Leu Leu Pro Asn Glu Asn  
 Val Asn Leu His Ile Val Lys Val Phe Asn Glu Ser Gly Trp Gly Tyr Ser Ser  
 Thr Leu Val Arg Ala Ile Glu Thr Cys Ala Asp Asn Gly Ala Lys Ile Val Asn  
 MET Ser Leu Gly Gly Ser Glu Ser Glu Ser Arg Thr Glu Glu Asn Ala MET Asp Ala  
 Leu Tyr Glu Arg Gly Val Leu MET Ile Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Asn Thr  
 Ala His Ser Tyr Pro Ala Ser Tyr Asp Ser Val MET Ser Val Ala Val Asp

Ser Asn Tyr Asp His Ala Ser Phe Ser Glu Ala Thr Asn Glu Val Glu Ile Ala  
 Ala Pro Gly Val Ala Val Leu Ser Thr Val Ser Val Gly Glu Gly Val Leu Ser  
 Thr Ile Thr Glu Asp Arg Asp Tyr Phe Arg Arg Gly Val Val Pro His Asn  
 Arg Leu Asn Asn Asn Gly Phe Gly Phe Glu Ser Ala Pro Ile Ala Gly Glu Tyr  
 Thr Ala Pro Leu Ala Leu Cys Asp Thr Ser Ser Gly Arg Tyr Glu Cys Gly Asp  
 MET Arg Gly Lys Ile Cys Leu Thr Glu Arg Ile Ala Asn Glu Thr Pro Ser Val  
 Arg Pro Glu Ile Asn Ala Val Ala Ala Cys Asn Asn Ala Gly Ala Leu Ala Ala  
 MET Val Tyr Ser Asn Glu Glu Arg Pro Gly Leu Glu Asn Pro Phe Val Leu Asp  
 Glu Phe Asn Thr Thr Pro Leu Leu Ser Val Ser Val Asn Arg Asn Val Gly Glu  
 Glu Leu Ala Ala Leu Val Gly Glu Asp Ile Thr Val Ser Thr Arg Thr Gly Glu  
 Asn Tyr Glu Tyr Tyr Asn Gly Thr Ser MET Ala Thr Pro His Val Ser Gly Val  
 Ala Gly Leu Val Thr Ser Tyr His Pro Glu Cys Ser Ala Lys Glu Ile Arg Glu  
 Ala Leu Thr Glu Thr Ala Leu Asp Leu Asp Val Leu Ala Arg Tyr Ile Val Leu  
 Asp Gly Ile Val Thr Ser Trp Arg Lys Ile Leu Thr Gly Glu

## 청구항2

제1항의 단백질 분해효소를 코딩하고 하기 염기서열을 갖는 유전자 :

GCT GAC AAG AAA AAA CCC AAA TAA CCA CAT AAA TAT CAG TCA GTT AAT CAG AAC  
 CCA TTA ACT TAT TTC GTT AAT TTT GTG ATC TTA TTT CAA TAA AAA TGC CAA TTA  
 TAA TTA TTT TCT TTT CTG TTT AAT TAT TTT GCG CTA TAC GTG ATC AAG TCA TTA  
 GTC TTG ATT ATG AAA TCT GCG CCA GTG ACA CGA TGG AAA TAT GAA ATG TTA GCG  
 GTC GAT TAT ACG ATC TGG CCA ACC GAC TTG ACG TTG CTG ACA ACT GCG AAA TCC  
 ATG ATC CTC CAT GAC TAT CAG TAA CAA CAC GAT GCG AGT GAG CGA ACC AAA TAG  
 TGT AGT ACG TGC AAG TCA ACT GCG TAA TAT ACG ATG ATC AAC CTG CAA AAA TAT  
 GCG TCA AAA ACG ACA GCG CAA ATG ATA AAA AAA AAC CAA TTA AAA GGT TAC GTT  
 AAA CTA GGT ACA ATA GCG ATG GTC GCG GGT AGT GCG ACT TCC GCG ATA GCT CAC  
 CCA ACG TTG ACA TTT GAT AAA GCG AGT ATT CCT ACT GGT TAT ATT GTC AAA TTT  
 AAA CAA GAT GAA CAG CCA TTC TCG ATG GCT AAT AAC CCA TTC TCG GCG CCA CGA  
 ATT GGT CAG CAA GCT-CTA TTA TCA CAG ATA CAA GCG AGT GAT ATT GAA GCT ATT  
 GGT CAT GAT GGT TTA TAC ACG GCG AAA CTA CCA GAA GAG GCG CTT GAA GCG CTC  
 GGT TCA GGT GCG GAT ATC CAG TAT GTA GAA ATC GAC CCA GCG GCG TTT TTA ATG  
 AGT GAA ACT ACG GCT TGG GGT TAC TTT GCG GTG AAA GCG GAT CAA TTA GAA GAT  
 ACG CAA GCT GCG AAT CAA ACG ATT TGT ATT ATT GAT TGT GGT TAC GAC CTC GCG  
 CAT AAC GAT TTG ACG GGT AAC CGA GTC ACT CGA ACG AAC GAT CGA CGA ACA CGA  
 CAA TGG TAC ATT CCA GGT ACG AAC AAT GCG CAT GGT ACC CAT GTC CGA GCG ACG  
 ATT GCG GCG ATC GCG AAC AAT GAA GCG GTA AAA GCG TTA CTA CCA AAT CAA AAC

GTG AAC TTA CAT ATT GTC AAA GTA TTC AAT GAG TCA GGT TGG GGA TAT TCA TGG  
 ACG CTA GTG CGA GCG ATT CAA ACT TGT GCG GAT AAT GCG CGA AAA ATT GTC AAT  
 ATG ACG TTA GCG GGT AGT CAA TCA ACG GCG ACG GAA CAA AAT CGA ATG GAC CGA  
 TTG TAT GAG CGA GGA GTA TTA ATG ATT GCT GCT GCG GGT AAC TCG GGT AAT ACG  
 GCG CAG AGT TAT GCT GCG TGT TAT GAT TCA GTG ATG TCT GTC GCT GCG GTT GAC  
 ACG AAT TAC GAT CAT GCT TCG TTC TCT CAA GCG ACT AAC CAA GTA GAA ATC GCG  
 GCG CGA CGA GTT GCG GTC CTC TCA ACA GTC ACG GTA GGT GAA GCG GTT TTA TCG  
 ACA ATA ATC ACT GAA GAT GGT GAT TAT TTC GCG GGT GGT GTC GTG CGA CAT AAT  
 GCG TTA AAT AAT AAT GCG TTT GGT TTT GAA TCG CGA GCG ATT GCG CGA CAA TAT  
 ACG CGA GGT TTA GCG GTG TGT GAT ACG AGT TGT GGT GCG TAT CAA TGT GCG GAT  
 ATG GGT GCG AAA ATT TGT GTC ACT GAA CGA ATC GCT AAT GAA ACG CGA TCG GTT  
 GGT GCG GAA ATT AAT GCG GTT CGA GCG TGC AAC AAT GCT GCG GCT TTA GCG GCG  
 ATG GTT TAC ACT AAT CAG CAA GGT CGA GCG CTC CAA AAT GCG TTT GTT CTC GAT  
 CAA TTT AAC ACT TAC CGA CTA TTG TCT GTC AGT GTC AAT GGT AAC GTA GCG CAA  
 GAA TTG GCG GCT TTA GTC GGT CAA GAC ATT ACG GTA TCG ACT GGT ACG GGT GAA  
 GAT TAT CAG TAC TAT AAT GCG ACT TCG ATG CGA ACA GCG CAG GTG TCA GCG GTT  
 CGA GCG TTA GTG TGG AGT TAT CAT CGA CAG TGC TCG CGA AAA CAG ATC GCG CAA  
 CGA TTA ACG CAA ACG GCG GTG GAT TTG GAT GTC GTG GCG AGA TAT ATC GTA CTG  
 GAT GGT ATT GTG ACG TCT TGG GCG AAA ATA TTA ACA GGT CAA TAG AAT GCG ACG  
 ATC GCG TAG ATT TGC TAT CAA GGT TTT GGT GCG GAT GGT TAT TTT CAG ACG GTG  
 TAA CGA ATG CTA AAG CAG GCG CAG AAC CAG ACG ACT ACA AAC GAT ACG GTG GCG  
 AAT TCG GAC GAA AAA ATG ATA ACG CAA ACG GCG TGC TGC TTT GAA TCG CGA CAA  
 AAT TCG GAC GAA AAA ATG ATA ACG CAA ACG GCG TGC TGC TTT GAA TCG CGA CAA

ACG AGT TTA TCT TCA CTG GGT ACT GGT ACT GAT GCG TCT TAT ATT GCT GAG GAT  
 AAG ACG ATC GAA CAA AAC CAG TCA ACG CGA GGT TTT TAT GTC AAA TAC CAT GGT  
 GAC AAA AAA ATC GTG GTG CTC GAA CTA CTG AAA ACG TT

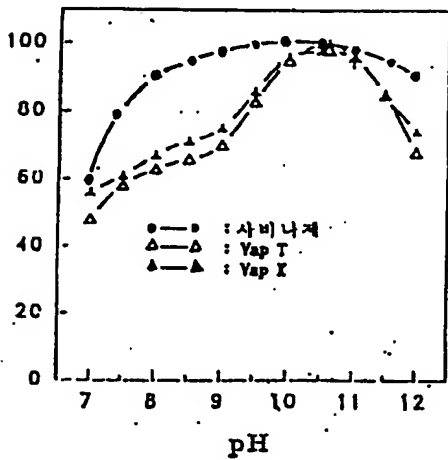
### 청구항3

비브리오 메취니코비 중 RH 530.

### 도면

도면1

상대활성도(%)



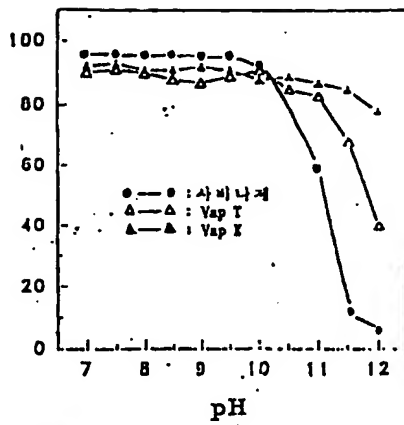
제 1표 반응 조건

1) 온도 : 25 °C

2) 반응 시간 : 10 분

도면2

관여활성도(%)



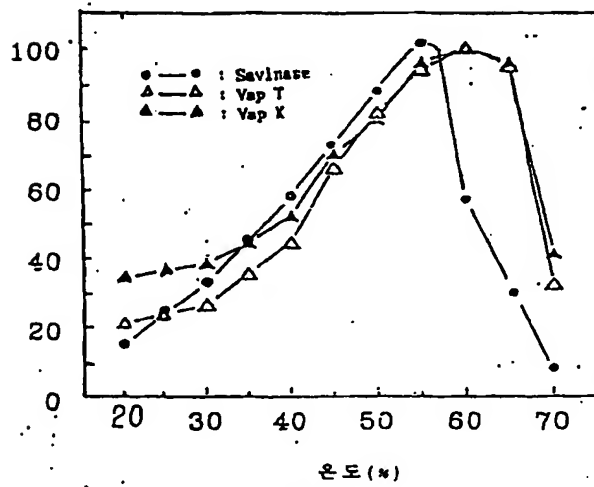
제 2도. 반응 조건

1) 보존 시간 및 온도 : 각 pH에서 24시간, 25 °C

2) 반응 시간 및 온도 : 10분, 25 °C

도면3

상대활성도(%)



제 3도. 반응 조건

1) pH : 10

2) 반응 시간 : 각 온도에서 10분

도면4

[illegible]

Diagram of the circular plasmid pAK1 (8.2 kb). The plasmid contains an ampicillin resistance gene (Ap) and an origin of replication (ori). Restriction enzyme sites for HindIII, PstI, EcoRV, and SspI are indicated around the circle.

PXI의 유전자지도.

[illegible]

도면 7



